

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 758 331

(21) N° d'enregistrement national : 97 00300

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 16/08, C 12 N 15/46, 15/85, 5/10, C 12 P
21/02, A 61 K 39/42, G 01 N 33/569

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 14.01.97.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE DE BOURGOGNE —
FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 17.07.98 Bulletin 98/29.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : ARMENGAUD AINE.

(54) NOUVEAUX MOYENS POUR LE DIAGNOSTIC, LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT VIS-A-VIS DE
CONTAMINATIONS OU D'INFECTIONS PAR DES VIRUS A TROPISME MUQUEUX.

(57) Les moyens de l'invention comportent des peptides
essentiellement constitués par une séquence d'acides ami-
nés capable de reconnaître selon une réaction de type
antigène-anticorps au moins un épitope d'un virus à tro-
pisme muqueux, impliqué dans les infections provoquées
par un tel virus. Les moyens de l'invention comportent éga-
lement les anticorps dirigés contre ces peptides et les li-
gands de ces peptides.

Applications au diagnostic, traitement thérapeutique et
vaccination chez l'homme et l'animal. §.

FR 2 758 331 - A1



ATTORNEY DOCKET NUMBER: 10271-072-999
—SERIAL NUMBER: 10/628,088
REFERENCE: B27

L'invention a pour objet de nouveaux moyens pour le diagnostic, la prévention et le traitement de l'homme ou de l'animal vis-à-vis de contaminations ou d'infections par des virus à tropisme muqueux.

5 Les virus à tropisme muqueux peuvent infecter diverses muqueuses humaines ou animales telles que les muqueuses respiratoire, intestinale ou vaginale, selon différents mécanismes. Les défenses immunologiques contre ces infections impliquent fréquemment la sécrétion d'IgA.

10 On citera les virus de la famille des *Reoviridae*, plus particulièrement du genre *Rotavirus* (dénommé ci-après RV), les virus de la famille des *Paramyxoviridae*, plus particulièrement du genre *Pneumovirus* tel que le virus respiratoire syncytial (dénommé ci-après VRS). Mais aussi les 15 papillomavirus, les adénovirus, les entérovirus, les poliovirus, les virus de la grippe ou encore les virus de l'immunodéficience humaine.

Ces virus posent des problèmes complexes en médecine humaine, dans les collectivités et en milieu hospitalier où 20 sont confinés des sujets particulièrement sensibles à de telles infections : nouveau-nés, bébés, prématurés en particulier, enfants, adultes immunodéprimés, personnes âgées, mais aussi en médecine vétérinaire dans le cas des élevages d'animaux comme les poulaillers ou les veaux.

25 De telles situations conduisent à des infections épidémiques d'autant plus lourdes et difficiles à gérer qu'elles peuvent donner lieu non seulement à des primo-infections, mais également à des ré-infections. Certaines de ces épidémies apparaissent, de plus, de manière périodique: 30 c'est le cas, par exemple, des infections à VRS au cours des mois d'hiver, de novembre, décembre et janvier.

Or, pour nombre de ces virus, les moyens prophylactiques ou thérapeutiques proposés à ce jour ne présentent pas l'efficacité souhaitée ou, pour certains, ne 35 sont même pas disponibles. Il en est ainsi en particulier en ce

qui concerne le VRS, agent infectieux de l'appareil respiratoire et responsable de bronchiolites et pneumonies sévères, et le Rotavirus, agent infectieux de l'appareil intestinal et responsable de gastroentérites sévères, pour lesquels il n'existe actuellement aucune thérapie, prophylaxie ou vaccination efficace.

Les recherches effectuées par les inventeurs dans ce domaine les ont conduits à étudier plus spécialement les régions déterminant la complémentarité, ou CDR, d'anticorps monoclonaux anti-virus à tropisme muqueux et à élaborer des séquences peptidiques de grand intérêt au regard de leurs propriétés immunologiques. Divers outils utiles pour le diagnostic, la prévention et le traitement des contaminations et infections par ces virus ont pu être ainsi élaborés.

L'invention a donc pour but de fournir de telles séquences peptidiques capables de reconnaître des épitopes clés dans une contamination ou infection virale, et en particulier capables de constituer des paratopes vis-à-vis de RV et de VRS.

Elle a également pour but de fournir les séquences de nucléotides correspondantes.

Selon encore un autre aspect, l'invention vise les applications de ces différentes séquences à des fins de diagnostic, préventives ou thérapeutiques dans le cas d'infection par des virus à tropisme muqueux, et notamment par RV ou VRS.

Les peptides de l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués par une séquence d'acides aminés capable de reconnaître, selon une réaction de type antigène-anticorps, au moins un épitope d'un virus à tropisme muqueux, impliqué dans les infections provoquées par un tel virus.

Une telle reconnaissance de l'épitope viral par le peptide peut être mise en évidence par exemple par une réaction antigène-anticorps comme par exemple l'ELISA.

L'invention vise en particulier des peptides tels qu'indiqués ci-dessus capables de neutraliser l'infection virale et, le cas échéant, d'inhiber la fusion entre cellules infectées et non infectées ou entre cellules et virus lorsque l'épitope viral est impliqué dans la fusion, et/ou encore d'exercer un effet protecteur par voie passive ou active et/ou d'inhiber la transcription du virus à tropisme muqueux.

De tels peptides sont encore caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence d'acides aminés possédant les propriétés d'un CDR d'anticorps anti-virus à tropisme muqueux.

10 L'expression "CDR" désigne une séquence d'acides aminés de régions hypervariables de l'anticorps impliquées dans la reconnaissance de sites antigéniques viraux majeurs.

15 Avantageusement, la séquence d'acides aminés des peptides de l'invention comprend une ou plusieurs séquences de ces régions CDR, et/ou un ou plusieurs analogues de telles séquences. Le terme "anologue", tel qu'utilisé selon l'invention, désigne une séquence d'acides aminés, différant de celle d'une région de CDR natif par un ou plusieurs acides aminés, mais présentant des propriétés immunologiques du type de celles observées avec le CDR natif, telles que mises en évidence dans les exemples. Les différences au niveau des séquences peuvent correspondre à des modifications d'un ou plusieurs acides aminés et/ou des substitutions de natifs 20 d'acides aminés par des groupes chimiques appropriés au regard des applications biologiques envisagées, ou des délétions. Elles peuvent également correspondre à la présence de natifs additionnels, par rapport aux séquences natives. Des peptides 25 préférés de ce type sont caractérisés en ce qu'ils présentent des propriétés de type antigène-anticorps avec VRS.

30 L'invention vise notamment les peptides caractérisés en ce qu'ils sont capables de réagir avec l'épitope 205-225 et/ou 255-278 de la protéine F de VRS.

Il s'agit en particulier de peptides correspondant à, ou analogues de régions CDR d'anticorps monoclonaux spécifiques du VRS, du sous-groupe A ou B.

Des peptides de ce groupe spécialement visés par l'invention répondent aux séquences d'acides aminés SEQ ID N°1 à SEQ ID N°12 et SEQ ID N°25 à SEQ ID N°42.

D'autres peptides préférés du type mentionné ci-dessus sont caractérisés en ce qu'ils présentent des propriétés de type antigène-anticorps avec RV.

L'invention vise notamment les peptides caractérisés en ce qu'ils dérivent d'anticorps capables de réagir avec le site III et/ou IV de la protéine VP6 de RV.

De tels peptides, avantageusement, correspondent à, ou sont des analogues de régions CDR d'anticorps monoclonaux à spécificité RV.

Des peptides de ce groupe spécialement visés par l'invention répondent aux séquences d'acides aminés SEQ ID N°13 à SEQ ID N°24.

On observera que les peptides décrits ci-dessus en rapport avec les régions de CDR peuvent correspondre à, ou constituer des analogues de régions de CDR de chaînes lourdes d'anticorps anti-virus à tropisme muqueux, et/ou de chaînes légères.

Les différents peptides peuvent se présenter sous forme linéaire, ou en variante sous forme cyclisée.

Les peptides de l'invention sont obtenus par synthèse peptidique, en utilisant avantageusement les techniques classiques, ou encore par génie génétique en utilisant les acides nucléiques définis ci-dessous.

En particulier, ils peuvent être produits par des cellules bactériennes, animales et végétales dans lesquelles sont insérées les séquences d'ADN portant l'information génétique correspondant à ces peptides et placées sous le contrôle de promoteurs appropriés.

De telles cellules modifiées, le cas échéant, les organismes ou les plantes constitués de telles cellules sont également comprises dans le champ de l'invention.

5 L'invention vise en effet également les acides nucléiques correspondant selon le code génétique universel aux peptides définis plus haut.

Ces acides nucléiques comprennent les ADN comportant l'information génétique correspondant auxdits peptides, avantageusement les ADN capables de coder pour ces peptides.
10 Ils comprennent également les ARN, notamment les ARNm, et les ADNc correspondants.

Les vecteurs de transfert et/ou d'expression tels que cosmidie, plasmide, phage, virus animal ou végétal renfermant de tels acides nucléiques, et les cellules hôtes contenant de tels vecteurs entrent également dans le champ de l'invention.
15

L'étude des composés définis ci-dessus a conduit à mettre en évidence des propriétés anti-virales de grand intérêt, comme illustré par les exemples.

Ainsi, les propriétés de neutralisation et, le cas échéant, d'inhibition de la fusion du virus et/ou de sa transcription, sont avantageusement mises à profit, pour le diagnostic, la prévention et le traitement de contaminations et d'infections par de tels virus à tropisme muqueux et la fabrication d'immunogènes en vue de vaccins.
20

25 L'invention vise ainsi des moyens, à savoir des compositions, des méthodes et des kits, pour détecter la présence du virus chez l'homme ou l'animal, ou pour mettre en évidence une réponse immunitaire à une contamination ou à une infection virale.

30 Les compositions de diagnostic de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent :

. pour détecter la présence du virus chez l'homme ou l'animal, d'au moins un peptide tel que défini ci-dessus, ou

· pour mettre en évidence une réponse immunitaire, d'au moins un anticorps dirigé contre un peptide de l'invention ou un ligand équivalent, c'est-à-dire se fixant sur le peptide, le peptide, l'anticorps ou le ligand, étant associé à un marqueur de la réaction de détection, tel qu'un radiomarqueur ou un marqueur enzymatique et, le cas échéant, à un véhicule approprié pour réaliser le diagnostic.

L'invention vise également une méthode de diagnostic in vitro d'une contamination ou d'une infection par un virus à tropisme muqueux, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un échantillon biologique, tel qu'un fluide corporel, avec

· pour détecter la présence du virus chez l'homme ou l'animal, d'au moins un peptide de l'invention, ou une composition de diagnostic telle que définie plus haut, dans des conditions permettant la mise en évidence d'une réaction du type antigène-anticorps, ou

· pour mettre en évidence une réponse immunitaire, avec au moins un anticorps anti-peptide, un ligand se fixant au peptide, ou une composition de diagnostic les renfermant, comme défini ci-dessus, et

- la révélation de la réaction produite lorsque l'antigène viral est présent.

L'invention vise en outre des kits pour le diagnostic d'une contamination ou d'une infection par un virus à tropisme muqueux.

Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un peptide, ou un anticorps anti-peptide, ou un ligand équivalent, et les réactifs appropriés pour la réaction de détection, notamment des marqueurs et des solvants.

L'administration de peptides selon l'invention ou le cas échéant d'anticorps anti-peptides ou de ligands se fixant à ces peptides s'avère de grand intérêt pour prévenir ou traiter

des infections par les virus à tropisme muqueux, notamment par VRS et RV.

L'invention vise donc également des compositions pharmaceutiques possédant des propriétés anti-virales, caractérisées en ce qu'elles renferment au moins un peptide à propriétés anti-virales tel que défini ci-dessus, un anticorps anti-peptide ou un ligand se fixant à ce peptide, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte.

L'invention vise plus spécialement les compositions élaborées à l'aide des peptides anti-VRS ou anti-RV. En particulier, l'invention vise les compositions pharmaceutiques anti-VRS, renfermant au moins un peptide répondant à l'une des séquences SEQ ID N°7 à SEQ ID N°12 et tout particulièrement à la séquence SEQ ID N°9 dont les propriétés neutralisantes présentent un grand intérêt.

Ces compositions sont administrables de préférence par voie nasale, par voie orale ou par voie parentérale, à raison de 1 à 80 mg/kg, sous différentes formes. On citera à titre d'exemple l'administration sous forme d'esters lourds, tels que décanoate, oenanthate ou palmitate, ou sous forme galénique retard.

Un autre aspect de l'invention revêtant un intérêt majeur concerne les applications vaccinales des anticorps dirigés contre lesdits peptides, ou de ligands équivalents.

De telles compositions vaccinales, qui sont caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'anticorps ou de ligands dirigés contre lesdits peptides en association avec un véhicule approprié, entrent également dans le cadre de l'invention.

Des compositions particulièrement avantageuses sont associées à au moins un autre vaccin, par exemple des vaccins pour l'enfance, ce qui permet de disposer de compositions vaccinales à large spectre.

Dans les applications prophylactiques, les anticorps anti-peptides de l'invention ou lesdits ligands sont

avantageusement conjugués à une molécule porteuse pour renforcer leur immunogénicité. A titre d'exemple, on citera des molécules de type haptène (anatoxine tétanique, anatoxine diphtérique ou autres).

En variante, les peptides ou anticorps anti-peptides, ou lesdits ligands, sont insérés dans une structure d'immunoglobuline A humaine, le cas échéant modifiée dans la région charpente de ses régions variables adjacentes au peptide, ou à l'anticorps anti-peptide inséré, ou au ligand, de manière notamment à rétablir dans l'IgA résultante, les propriétés dudit peptide ou anticorps anti-peptide.

La présentation des peptides est réalisée sous forme de fragment de type ScFv, ou d'insertion dans une structure de protéine hexon d'adénovirus.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent.

Dans les exemples qui vont suivre, donnés à titre illustratifs et non limitatifs, il est fait référence aux figures 1 à 5 qui représentent :

- la figure 1, la neutralisation du pouvoir infectieux du VRS par le peptide synthétique homologue du CDR3 de la chaîne lourde de l'anticorps RS-348 (PEP3H).

- la figure 2, les chaînes V_H et V_L d'anticorps monoclonaux anti-VRS,

- la figure 3, les CDR de ces chaînes,

- la figure 4, les chaînes V_H et V_L 138 et 133, et

- la figure 5, les séquences de peptides synthétiques anti-VRS.

Exemple 1: Production d'anticorps monoclonaux anti-VRS et d'anticorps monoclonaux anti-VR

- obtention des hybridomes

Des souris BALB/c ont été infectées

- en intranasal avec

. 10^4 pfu (unités formant plage) de VRS souche A2 ou Long ou

- en intrapéritonéal

. 10^4 pfu de RV souche bovine RF.

5 Les cellules spléniques de souris sont récoltées et fusionnées avec des cellules de myélome SP2/O selon les techniques classiques.

10 Les hybridomes (cellules hybridomales) secrétant soit des anticorps anti-VRS, soit des anticorps anti-RV, ont été sélectionnés par IF ou ELISA, clonées et conservées par congélation.

- conditions de culture

15 Après décongélation, les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640-10% SVF (Sérum de Veau Foetal) dans une étuve à 37°C, 5% CO₂.

-déttection des anticorps par immunofluorescence indirecte (IF).

20 Les surnageants d'hybridomes sont incubés 30 minutes à 37°C dans des puits recouverts de cellules Hep 2 (cellules humaines) infectées ou non (témoins) par la souche A2 ou Long du virus syncytial respiratoire, ou cellules MA104 (cellules de rein de singe) infectées ou non par la souche bovine RF du rotavirus.

25 Après 3 lavages au PBS, les anticorps présents sont révélés par une incubation de 30 minutes avec un anticorps anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine. Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence.

30 Les résultats rapportés dans les exemples ci-après concernent les six anticorps monoclonaux suivants, à savoir : quatre anticorps monoclonaux anti-VRS, appelés respectivement RS-348, RS-18B2, RS-2B8 et RS-255, et deux anticorps monoclonaux anti-RV, appelés RV-133 et RV-138.

. anticorps monoclonaux anti-VRS

Les quatre anticorps monoclonaux anti-VRS, RS-348, RS-18B2, RS-2B8 et RS-255, reconnaissent des épitopes proches sur la protéine de fusion F du VRS et sont tous, excepté RS-255 qui a été obtenu à partir du site 255-275 de la protéine F du VRS, des IgG1 fortement neutralisants.

L'anticorps RS-348 possède une très forte activité neutralisante. Il reconnaît les souches de VRS des sous-groupes A et B en immunofluorescence alors qu'il présente une spécificité de sous-groupe en neutralisation. L'épitope des anticorps RS ci-dessous, tel qu'identifié par différentes techniques, est très conformationnel et est situé principalement entre les acides aminés 190 et 289 de la protéine de fusion du VRS (sites 205-225 et 255-278).

. anticorps monoclonaux anti-RV

Les deux anticorps monoclonaux anti-rotavirus, RV-133 et RV-138, reconnaissent tous deux des sites antigéniques proches sur la protéine de capsid interne du rotavirus, VP6. Cependant, RV-133 à la différence de RV-138, reconnaît un épitope de groupe commun à toutes les souches du groupe A ayant un rapport avec la région de VP6 impliquée dans la transcription virale. En effet, la restauration de l'activité transcriptase n'a pas lieu lorsque VP6 est préalablement incubée avec l'anticorps RV-133 avant la réassociation avec les cores (voir "Inhibition of in vitro reconstitution of rotavirus transcriptionally active particles by anti-VP6 monoclonal antibodies". Evelyne KOHLI, Pierre POTHIER, Guenola TOSSER, Jean COHEN, Anna-Maria SANDINO et Eugenio SPENCER, Archives of Virology 1994, 135, 193-200).

Exemple 2: Obtention des séquences en acides aminés des chaînes lourdes et légères des anticorps monoclonaux à tropisme muqueux anti-VRS et anti-RV.

Les séquences en acides aminés sont déduites des séquences en ADN des gènes V_H et V_L .

35 - Extraction et purification des ARNm

Cette étape est réalisée à l'aide d'un kit QuickPrepR Micro mRNA purification commercialisé par Pharmacia-Biotech, à partir de 10^6 cellules hybridomales.

- Extraction des ARN totaux :

5 Les cellules d'hybridome sont centrifugées et le culot est repris dans 0,4 ml de tampon d'extraction (thiocyanate de guanidium et N-lauroyl sarcosine) puis 0.8 ml de tampon d'élution (Tris-HCl pH 7,5 10 mM ; EDTA 1mM).

- purification des ARNm sur colonne oligo(dT)

10 L'échantillon d'ARN totaux est ajouté au gel de cellulose-oligo (dT) homogénéisé et débarrassé de son tampon de stockage. Le tout est centrifugé et lavé 5 fois avec un tampon à forte concentration en sels puis 3 fois avec un tampon à faible concentration de sels.

15 Le gel remis en suspension dans ce dernier tampon est transféré dans une colonne (MicroSpin ®, Pharmacia) placée dans un microtube. Après 3 lavages avec le tampon low-salt, les ARNm sont élués avec le tampon d'élution, puis conservés dans la glace.

20 - précipitation des ARNm

L'éluat est additionné d'une solution de glycogène, d'acétate de potassium et d'éthanol 95% avant d'être placé 30 minutes à -20°C. Après centrifugation, on récupère les ARNm dans le culot, puis on les remet en suspension dans du tampon d'élution.

- Synthèse de l'ADNc

La synthèse est réalisée en duplicata, un tube servant pour l'amplification de VH (région variable de chaîne lourde) et l'autre pour VL (région variable de chaîne légère).

30 Après chauffage à 65°C pour éliminer les structures secondaires, les ARNm (5μl) sont incubés pendant 1 heure en présence de 1μl de dithiothréitol (DTT) 200 mM, 11μl d'un mélange réactionnel contenant une transcriptase inverse (origine : virus de la leucémie murine), des amorces et les 4

didéoxynucléotides (ddNTP) à 1,25 mM chacun, et 16 µl d'eau distillée.

- Amplification par PCR de l'ADN codant pour les gènes VH et VL

5 - conditions d'amplification :

L'amplification des gènes codant pour VH et VL est réalisée séparément par PCR grâce à des amorces spécifiques du commerce : H1 (Heavy primer 1) et H2 (Heavy primer 2) pour amplifier VH, L (Light primer mix) pour amplifier VL
10 (Pharmacia-Biotech).

Les mélanges réactionnels sont les suivants :

* pour VH : 33 µl d'ADNc, 2 µl d'amorce H1, 2 µl d'amorce H2 et 62 µl d'eau distillée.

15 * pour VL : 33 µl d'ADNc, 2 µl d'amorce L et 64 µl d'eau distillée.

Chaque échantillon est recouvert d'huile minérale et, après dénaturation à 95°C pendant 1 minute, 1 µl de Taq polymérase (Bioprobe) est ajouté. Les tubes sont ensuite placés
20 dans le thermocycleur (PHC-3, Techne) programmé pour 30 cycles de 3 étapes :

- . dénaturation de l'ADN bicaténaire à 94°C, 1 minute,
- . hybridation des amorces à 55°C, 2 minutes,
- . élongation du brin complémentaire à 72°C, 2

25 minutes.

- purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide d'un kit QIAquick PCR purification® de QIAGEN. Une aliquote est ensuite déposée sur gel d'agarose-BET (BET = bromure d'éthidium) pour
30 vérifier la bonne amplification des gènes.

- Séquençage des produits de PCR

Le séquençage des produits de PCR est réalisé sur un thermocycleur (GeneAmp PCR system 2400) selon la méthode non-radioactive des terminateurs colorants. Cette technique s'apparente à la méthode de séquençage de Sanger basée sur les
35

didéoxynucléotides (ddNTP). Chaque ddNTP est marqué par un fluorophore différent, ce qui permet à la chaîne d'ADN en formation de se terminer et d'être simultanément marquée par le fluorophore correspondant à la dernière base ajoutée.

5 Les produits séquencés sont ensuite séparés par migration électrophorétique dans un séquenceur automatique, tel que le séquenceur à ADN 373 stretch qui possède un système optique basé sur un laser couplé à un programme d'analyse informatique. Tous les appareils et réactifs utilisés sont
10 commercialisés par Perkin-Elmer.

Les amores de séquençage ont été déduites de diverses séquences consensus de gènes VH et VL synthétisées par Eurogentec (KABAT E.A., WU T.T., REID-MILLER M., PERRY H.M., GOTTESMAN K.S. 1987. Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office ; KABAT E.A., WU T.T., PERRY H.M., GOTTESMAN K.S., FOELLER C. 1991. Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, MD).

20
- réaction de séquençage

La réaction de séquençage est réalisée à l'aide d'un mélange réactionnel prêt à l'emploi : le kit de séquençage par cycle pour terminateurs colorants ABI PRISM®. Ce milieu contient les 4 ddNTP marqués différemment (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP), les 4 dNTP non marqués (dITP, dATP, dCTP et dTTP), du Tris-HCl (pH9,0), MgCl₂, une pyrophosphatase et l'ADN polymérase AmpliTaq FS.

30 Dans un tube à PCR adapté au thermocycleur, environ 30 ng de produit de PCR purifié sont ajoutés à 1 µl d'amorce de séquençage (à 3,2 pmol/µl), à 8 µl du milieu réactionnel et d'eau ultrapure (qsp 20 µl).

Les tubes de réaction sont ensuite placés dans le thermocycleur programmé pour 25 cycles de 3 étapes :

- * dénaturation : 96°C, 10s,
 - * hybridation de l'amorce : 50° C, 5s,
 - * élongation : 60°C, 4 min.
- purification des produits séquencés

5 L'excès de nucléotides est éliminé par une précipitation à l'éthanol des produits de séquençage. Les 20 µl de réaction sont transférés dans un microtube à centrifuger de 1,5 ml où 2 µl d'acétate de sodium 3M (pH 4,6) et 50 µl d'éthanol 95 % ont été déposés. Les tubes sont placés 10 minutes dans la glace, puis centrifugés 20 à 30 minutes à vitesse maximale. Après décantation, les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70% puis séchés.

10 Un tampon de dépôt est préparé en mélangeant 5 µl de formamide déionisé et 1 µl d'EDTA 50 mM (pH 8,0). Chaque 15 culot de produit de séquençage est repris dans 4 µl de ce mélange avant d'être déposé sur le gel de migration.

- séparation des produits de séquençage par migration électrophorétique.

20 Un gel de polyacrylamide à 4,75 % est préparé au moins 2 heures avant la migration afin d'obtenir une bonne polymérisation.

25 Pour 80 ml de gel, 40 g d'urée sont dissous dans environ 27 ml d'eau ultrapure auxquels sont ajoutés 1 g de résine et 9,5 ml d'une solution stock d'acrylamide à 40 % (38 g d'acrylamide et 2 g de bis-acrylamide dans qsp 100 ml d'eau). Le mélange est agité pendant 5 minutes, puis filtré et dégazé. 8 ml d'une solution stock de Tris Borate EDTA 10X (108g de Tris base, 55 g de borate et 8,3 g d'EDTA pour 1 litre) sont ajoutés et le volume final est porté à 80 ml avec de l'eau. Le gel, 30 d'une épaisseur de 0,4 mm, est coulé entre 2 plaques de verre après l'addition des catalyseurs : Temed (45 µl), Temed = N, N, N', N'- tétraméthyléthylénediamine et ammonium peroxydisulfate à 0,1g/ml (400 µl). La face interne des plaques est préalablement nettoyée grâce à un détergent, puis rincée 35 plusieurs fois à l'eau distillée et séchée.

Après polymérisation du gel, les plaques de verre sont nettoyées extérieurement de la même manière que précédemment et leur propreté est vérifiée directement dans la cuve à électrophorèse du séquenceur par le laser. Une fois les plaques bien propres, le gel peut être placé dans la cuve et le tampon de migration ajouté (TBE 1X). Une pré-migration est ensuite effectuée pendant 15 minutes afin de préchauffer le gel avant le dépôt des échantillons.

Les échantillons sont déposés en haut du gel après une dénaturation de 2 minutes à 90°C et la migration est lancée en même temps que la collection des données par le programme informatique.

Les produits purifiés et séparés sont ensuite clonés selon les techniques classiques, puis séquencés.

Le séquençage des acides nucléiques a été réalisé sur des ADN double brin à l'aide d'un séquenceur à ADN automatisé (ABI).

- séquences : Après séquençage, la déduction de la séquence en acides aminés suivant le code génétique a permis d'identifier les 3 régions de CDR sur la chaîne lourde et les 3 régions de CDR sur la chaîne légère, chez chaque anticorps monoclonal.

Chacune des régions CDR est identifiée par homologie avec les séquences d'immunoglobulines déjà publiées.

L'ensemble de ces séquences est rapporté dans la liste de séquences en fin de description.

De plus, on a représenté sur la figure 2, la séquence en acides aminés, selon le code à 1 lettre, des V_s et V_l pour RS-348, RS-18B2, RS-2B8 et RS-255. Les CDR sont indiqués et soulignés et sont donnés sur la figure 3.

De plus, les chaînes V_s et V_l 138 et 133 sont données, selon le code à 1 lettre, sur la figure 4.

Pour l'anticorps monoclonal RS-348, les séquences en acides aminés des CDR 1,2,3 de chaîne lourde sont référencées,

respectivement, sous SEQ ID n°1,2,3, et celles des CDR 1,2,3 de chaîne légère sous SEQ ID n°4,5,6.

5 Pour l'anticorps monoclonal RV-138, les séquences en acides aminés des CDR 1,2,3 de chaîne lourde sont référencées, respectivement, sous SEQ ID n°13,14,15 et celles des CDR 1,2,3 de chaîne légère sous SEQ ID n°16,17,18.

10 Pour l'anticorps monoclonal RV-133, les séquences en acides aminés des CDR 1,2,3 de chaîne lourde sont référencées, respectivement, sous SEQ ID n°19,20,21 et celles des CDR 1,2,3 de chaîne légère sous SEQ ID n°22,23,24.

15 Pour l'anticorps monoclonal RS-18B2, les séquences en acides aminés des CDR 1,2,3 de chaîne lourde sont référencées, respectivement, sous SEQ ID n° 25,26,27 et celles des CDR 1,2,3 de chaîne légère sous SEQ ID n°28,29,30.

20 Pour l'anticorps monoclonal RS-2B8, les séquences en acides aminés des CDR 1,2,3 de chaîne lourde sont référencées, respectivement, sous SEQ ID n° 31,32,33 et celles des CDR 1,2,3 de chaîne légère sous SEQ ID n°34,35,36.

25 Pour l'anticorps monoclonal RS-255, les séquences en acides aminés des CDR 1,2,3 de chaîne lourde sont référencées, respectivement, sous SEQ ID n° 37,38,39 et celles des CDR 1,2,3 de chaîne légère sous SEQ ID n°40,41,42.

Exemple 3: Peptides anti-VRS

30 On a préparé par voie de synthèse des peptides de 20 acides aminés correspondant à chacune des 6 régions CDR de RS-348 et comportant des acides aminés de la région ossature ajoutés à chaque extrémité des CDR pour parvenir à cette longueur ou pour faciliter la synthèse.

35 Pour obtenir des peptides cyclisés, on a ajouté une cystéine à chacune des deux extrémités.

La synthèse a été réalisée avec un synthétiseur automatique Milligen® 9050, selon une méthode en phase solide qui utilise des acides aminés activés par des esters N^α-Fmoc

protégés, sur une résine polystyrène (PEG-PS). L'acylation a été réalisée dans du DMF anhydre en utilisant des esters activés de chaque acide aminé (Dhbt pour Thr et Ser, Pfp pour les autres) avec de l'1-hydroxybenzotriazole (HOBr) ou de l'1-hydroxy 7-azabenzotriazole (HOAt) comme réactifs de couplage. De la pipéridine à 20% dans du DMF a été utilisée pour les étapes de déprotection en N^a.

En fin de synthèse, les chaînes latérales peptidiques ont été déprotégées et extraites de la phase solide par clivage à l'acide trifluoroacétique avec le réactif dérivé de King pendant 2 heures, en l'absence de lumière et d'oxygène. Les groupements thiol des cystéines C- et N-terminales étaient ainsi libres de leurs groupements trityl protecteurs et ont donc pu former des ponts disulfure pour la cyclisation peptidique.

Les peptides ont alors été récupérés par précipitation dans de l'éther d'éthyle froid, centrifugations et lavages répétés dans de l'éther. Les précipités ont été remis en suspension dans de l'eau distillée.

La forme cyclique des peptides a été obtenue par oxydation spontanée des groupements Cys thiol : un aliquot de 25 µmole (1mg/ml) déprotoisé par NaOH (pH final = 8 à 8,5) a été maintenu une nuit durant sous forte agitation.

La forme linéaire des peptides a été obtenue en maintenant la protonation (pH = 5,5 à 6,5) et, en cas d'insolubilisation, par mélange avec du PBS dégazé (pH = 7,4) sous bullage d'azote de manière à empêcher la cyclisation.

Les solutions de peptides sont ensuite rapidement congelées.

Les séquences des peptides synthétisés homologues des 6 CDRs de l'anticorps monoclonal RS-348 sont rapportées dans le listing de séquences joint.

Les séquences référencées sous SEQ ID n°7,8,9 représentent, respectivement, les séquences des peptides PEP1H348, PEP2H348, PEP3H348, c'est-à-dire les séquences des

peptides synthétiques construits par homologie avec les CDR 1,2,3, respectivement, de la chaîne lourde de RS-348.

Les séquences référencées sous SEQ ID n°10,11,12 représentent, respectivement, les séquences des peptides PEP1L348, PEP2L348, PEP3L348, c'est-à-dire les séquences des peptides synthétiques construits par homologie avec les CDR 1,2,3, respectivement, de la chaîne légère de RS-348.

De plus, on a représenté sur la figure 5, les séquences de ces peptides synthétiques selon le code à 1 lettre.

Exemple 4: Etude des propriétés fonctionnelles immunologiques des peptides de l'exemple 3

- activité de neutralisation

Des tests de neutralisation de VRS de souche Long (sous-groupe A) ont été réalisés par mesure de réduction de plaques.

5 x 10³ pfu/ml de virus ont été mélangées pendant 1h à 37°C avec une dilution en série des peptides (de 15 µg à 0,875 µg) sous la forme cyclique ou linéaire.

Des monocouches de cellules Hep-2 sur plaques à 6 puits ont alors été infectées.

La neutralisation a été mesurée, pour chaque concentration en peptides testée, lorsqu'une réduction de plaques de 50% est observée et est exprimée en log₁₀ moyen par quantité de peptides.

Aucune toxicité des peptides synthétiques n'a été détectée. L'activité neutralisante apparaît particulièrement élevée avec le peptide SEQ ID n°9. Celle-ci s'observe que le peptide soit présenté sous forme cyclique ou linéaire. Le peptide linéaire a, cependant, une activité neutralisante dans une plus large gamme de concentrations.

Les résultats obtenus avec le peptide sont rapportés sur la figure 1 où le % d'inhibition du pouvoir infectieux du virus est donné en ordonnée et la quantité de peptides est indiqué en abscisse, (—○— pour la forme cyclique du peptide, —□— pour la forme linéaire).

En revanche, l'étude de la capacité à neutraliser une souche de sous-groupe B montre qu'aucun des peptides SEQ ID n°7 à 12 ne présente une forte activité neutralisante sur ce sous-groupe. Ces résultats indiquent que le peptide homologue au CDR3 de la chaîne lourde de RS-348 (SEQ ID n°9) est fortement neutralisant, qu'il porte de plus une spécificité de sous-groupe (A) et que la conformation imposée par la cyclisation n'influe pas sur la spécificité de cette activité.

- Immunisation passive de souris (effet protecteur).

Une préparation de peptides, d'anticorps monoclonal, ou de PBS (témoin), a été administrée par voie nasale à des lots de 10 souris Balb/c. Les animaux ont été infectés 4 heures plus tard intranasalement avec la souche Long du virus respiratoire syncytial diluée dans du milieu BME.

Cinq jours après exposition au VRS, les poumons de chaque souris ont été homogénéisés et le taux d'infection par VRS mesuré en unités formant plaque (pfu).

Les résultats indiquent que la protection par l'immunisation passive est totale avec l'anticorps RS-348 et nulle avec le PBS témoin.

Un pouvoir protecteur important a été observé avec les peptides synthétiques homologues des CDRs de RS-348 (SEQ ID n°7 à 12), tout particulièrement avec PEP3H, le peptide synthétique homologue du CDR3 de la chaîne lourde de l'anticorps RS-348 (SEQ ID n°9), comme indiqué sur le tableau ci-dessous:

Molécule testée	Diminution du titre en virus dans les poumons de souris
RS-348 (dilué au 1/25 dans fluide ascitique)	> 1,5
PEP3H (70µg/souris)	0,22
PEP3H (140 µg/souris) cyclique	1,02

Dans ce tableau, la diminution du titre en virus dans les poumons de souris a été calculée de la manière suivante:

5 (log₁₀ moyen des pfu par gramme de tissus de poumons de souris témoins) - (log₁₀ moyen des pfu par gramme de tissus de poumons de souris ayant reçu une dose de molécules à tester). Les titres moyens en virus sont statistiquement différents de ceux des souris témoins.

10 **Exemple 5: Tests thérapeutiques chez les souris**

Six lots de chacun 10 souris femelles BALB/c âgées de 10 semaines ont été utilisés. Chaque animal pesait environ 20g.

Chacune des souris a été inoculée intranasalement avec 10⁸ pfu de VRS souche Long dilué dans du milieu BME.

15 Deux jours plus tard, chacune des souris a ensuite subi l'un des traitements suivants:

- aucun traitement: témoin expérimental,
- inoculation intranasale de PBS :témoin inoculation,
- inoculation intranasale de PEP3H (peptide homologue

20 au CDR3 de la chaîne lourde de RS-348, (SEQ ID n°9) sous forme linéaire à raison de 70µg par souris, ou

- inoculation intranasale de PEP3H (SEQ ID n°9) sous forme linéaire à raison de 140µg par souris,

- inoculation intranasale de PEP3H (SEQ ID n°9) sous forme cyclique à raison de 70 μ g par souris, ou
- inoculation intranasale de PEP3H (SEQ ID n°9) sous forme cyclique à raison de 140 μ g par souris.

5 Toutes les inoculations ont été réalisées sous anesthésie à la kétamine/xylamine.

Un jour plus tard, toutes les souris ont été sacrifiées et leurs poumons récoltés. La concentration en RSV des homogénats de poumons a été mesurée par test sur plaque 10 avec des cellules Hep-2 et par coloration au rouge neutre.

La diminution moyenne des concentrations en RSV mesurées pour chacun des traitements thérapeutiques testés a été calculée de la manière suivante : (\log^{10} moyen des pfu par 15 gramme de tissus de poumons de souris témoins expérimentaux) - (\log^{10} moyen des pfu par gramme de tissus de poumons des souris ayant subi le traitement testé).

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Universite de Bourgogne
- (B) RUE: Esplanade Erasme
- (C) VILLE: DIJON
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 21000
- (G) TELEPHONE: 03 80 39 50 00

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Nouveaux moyens pour le diagnostic, la prévention et le traitement vis-à-vis de contaminations ou d'infections par des virus à tropisme muqueux.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 42

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: CDR1H348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Asn Tyr Ala Val His
1 5

(3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2H348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Leu Tyr Lys Ser Ala Leu Met Pro
1 5 10 15

(4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR3H348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Asp Pro Asp Tyr Tyr Asp Asn Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

(5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1L348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Thr Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10 15

Leu Ala

(6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 7 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR2L348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser
1 5

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 8 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR3L348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Phe Thr
1 5

(8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 14 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: PEP1H348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7;

Cys Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Ala Val His Trp Val Cys
1 5 10

(9) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
 - ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
 - iii) HYPOTHETIQUE: NON
 - iv) ANTI-SENS: NON
 - ii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: PEP2H348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Cys Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Leu Tyr Lys Ser Ala Leu Met
 1 5 10 15
 Pro Arg Cys

(10) INFORMATIONS POUR LA SEO TD NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
 - (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
 - (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 - (iv) ANTI-SENS: NON
 - (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: PEP3H348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Cys	Ala	Arg	Asp	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp
1				5				10					15	
Tyr	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Cys								
				20										

(11) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: PEP1L348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Phe	Asn	Thr	Arg	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala
1				5				10					15		
Cys															

(12) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: PEP2L348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Cys	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Ser	Gly	Pro	Asp
1				5				10					15		
Arg	Phe	Cys													

(13) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 acides amines

(B) TYPE: acide amine
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vii) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: PEP3L348

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Cys Tyr Tyr Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
1 5 10 15

Lys Cys

(14) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 5 acides amines
(B) TYPE: acide amine
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1H138

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

Ser His Trp Ile Glu
1 5

(15) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 17 acides amines
(B) TYPE: acide amine
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2H138

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Glu Ile Phe Pro Gly Arg Ile Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 8 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR3H138

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

Glu Gly Ala Tyr Gly Asn His Val
1 5

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1L138

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Ala Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

(18) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 7 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vi) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2L138

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

(19) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 8 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vi) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR3L138

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr
1 5

(20) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1H133

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

Ser Tyr Trp Ile His
1 5

(21) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2H133

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

Ile Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asp Glu Lys Phe Phe
1 5 10 15

Thr

(22) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 13 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR3H133

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

Ser Tyr Arg Asn Asp Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

(23) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1L133

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

Ser Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

(24) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 7 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2L133

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

(25) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 9 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR3L133

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

(26) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1H18B2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

Asn Tyr Ala Val His
1 5

(27) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 16 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR2H18B2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Leu Tyr Lys Ser Ala Leu Met
1 5 10 15

Pro

(28) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 14 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR3H18B2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

Asp Pro Asp Tyr Tyr Asp Asn Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

(29) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1L18B2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

Ser Ala Arg Ser Ser Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Tyr Met
1 5 10 15
His

(30) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 7 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2L18B2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser
1 5

(31) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 9 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR3L18B2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

Phe Gln Gly Ser Glu Phe Pro His Thr
1 5

(32) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(iii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(viii) HYPOTHETIQUE: NON

(ix) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR1H2B8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

Ser Tyr Asp Ile Ser
1 5

(33) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(iii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(viii) HYPOTHETIQUE: NON

(ix) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: CDR2H2B8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Try Try Asn Ser Ala Phe
1 5 10
Met Ser
15

(34) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 9 acides amines
- (B) TYPE: acide amine

(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vi) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: CDR3H2B8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

Arg Thr Gly Thr Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5

(35) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 17 acides amines
(B) TYPE: acide amine
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vi) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: CDR1L2B8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Xaa Xaa Tyr
1 5 10 15
Met His

(36) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 7 acides amines
(B) TYPE: acide amine
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: CDR2L2B8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

Leu Val Cys Asp Leu Glu Ser
1 5

(37) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 8 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: CDR3L2B8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

Gln His Ile Arg Gln Pro Tyr Thr
1 5

(38) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides amines
- (B) TYPE: acide amine
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: des deux

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

(vii) SOURCE IMMEDIATE:
(B) CLONE: CDR1H255

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

Ser Phe Gly Met His
1 5

(39) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR2H255

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
1 5 10 15
Lys Gly

(40) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 39:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 9 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR3H255

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

Ser Arg Leu Arg Thr Val Met Asp Tyr
1 5

(41) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 40:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR1L255

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

Arg Ala Ser Gln Pro Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa

(42) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 41:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 7 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR2L255

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
1 5

(43) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 42:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 9 acides amines
 - (B) TYPE: acide amine
 - (C) NOMBRE DE BRINS:
 - (D) CONFIGURATION: des deux
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 - (B) CLONE: CDR3L255

2758331

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro The Thr
1 5

REVENDICATIONS

- 5 1. Peptides caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués par une séquence d'acides aminés capable de reconnaître, selon une réaction de type antigène-anticorps, au moins un épitope d'un virus à tropisme muqueux, impliqué dans les infections provoquées par un tel virus.
- 10 2. Peptides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont capables de neutraliser l'infection virale et, le cas échéant, d'inhiber la fusion entre cellules infectées et non infectées, ou entre cellules et virus, et/ou d'exercer un effet protecteur par voie passive ou active et/ou d'inhiber la transcription du virus à tropisme muqueux.
- 15 3. Peptides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils présentent une spécificité de sous-groupe viral en neutralisation.
- 20 4. Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence d'acides aminés possédant les propriétés d'un CDR d'anticorps anti-virus à tropisme muqueux.
- 25 5. Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils présentent des propriétés de type antigène-anticorps avec VRS.
- 30 6. Peptides selon la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils sont capables de réagir avec l'épitope 205-225 et/ou 255-278 de la protéine F de VRS.
- 35 7. Peptides selon la revendication 5 ou 6, caractérisés en ce qu'ils correspondent à, ou constituent des analogues de régions de CDR d'anticorps monoclonaux à spécificité VRS, de sous-groupe A ou B.
8. Peptides selon l'une quelconque des revendication 5 à 7, caractérisés en ce qu'ils répondent aux séquences d'acides aminés SEQ ID N°1 à SEQ ID N°12 et SEQ ID N°25 à SEQ ID N°42.

9. Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils présentent des propriétés de type antigène-anticorps avec RV.

10. Peptides selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'ils dérivent d'anticorps capables de réagir avec le site III et/ou IV de la protéine VP6 de RV.

11. Peptides selon la revendication 9 ou 10, caractérisés en ce qu'ils correspondent à, ou sont des analogues de régions CDR d'anticorps monoclonaux à spécificité RV.

12. Peptides selon l'une quelconque des revendication 9 à 11, caractérisés en ce qu'ils répondent aux séquences d'acides aminés SEQ ID N°13 à SEQ ID N°24.

13. Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisés en ce qu'ils présentent sous forme linéaire ou forme cyclisée.

14. Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15. Acides nucléiques caractérisés en ce qu'ils comprennent les ADN comportant l'information génétique correspondant aux peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, avantagereusement les ADN capables de coder pour les peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ainsi que les ARN, notamment les ARNm, et les ADNc correspondants.

16. Vecteurs de transfert et d'expression tels que cosmide, plasmide, phage, virus animal ou végétal renfermant des acides nucléiques selon la revendication 15 et cellules hôtes contenant de tels vecteurs.

17. Procédé d'obtention de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'on opère par voie de synthèse ou selon les techniques du génie génétique, en utilisant les acides nucléiques ou les vecteurs ou les cellules hôtes selon les revendications 15 ou 16.

18. Compositions de diagnostic, caractérisées en ce qu'elles comprennent pour détecter la présence d'un virus à

tropisme muqueux, en particulier de RV ou VRS chez l'homme ou l'animal, d'au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, ou pour mettre en évidence une réponse immunitaire, d'au moins un anticorps selon la revendication 14, 5 ou un ligand équivalent, le peptide, l'anticorps ou le ligand, étant associé à un marqueur de la réaction de détection, tel qu'un radiomarqueur ou un marqueur enzymatique et, le cas échéant, à un véhicule approprié pour réaliser le diagnostic.

10 19. Méthode de diagnostic in vitro de contamination ou d'une infection par un virus à tropisme muqueux, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique, tel qu'un fluide corporel, avec
 - . pour détecter la présence du virus chez l'homme ou l'animal, d'au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, ou une composition de diagnostic selon la revendication 18, dans des conditions permettant la mise en évidence d'une réaction du type antigène-anticorps, ou
 - . pour mettre en évidence une réponse immunitaire, avec au moins un anticorps anti-peptide selon la revendication 14, un ligand se fixant au peptide, ou une composition de diagnostic les renfermant selon la revendication 18, et
 - la révélation de la réaction produite lorsque l'antigène viral est présent.

25 20. Kits pour le diagnostic d'une contamination ou d'une infection par un virus à tropisme muqueux caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, ou un anticorps anti-peptide selon la revendication 14, ou un ligand, et les réactifs appropriés pour la réaction de détection, notamment 30 des marqueurs et des solvants.

21. Compositions pharmaceutiques possédant des propriétés anti-virales, caractérisées en ce qu'elles renferment au moins un peptide à propriétés anti-virales selon

l'une quelconque des revendications 1 à 13, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte.

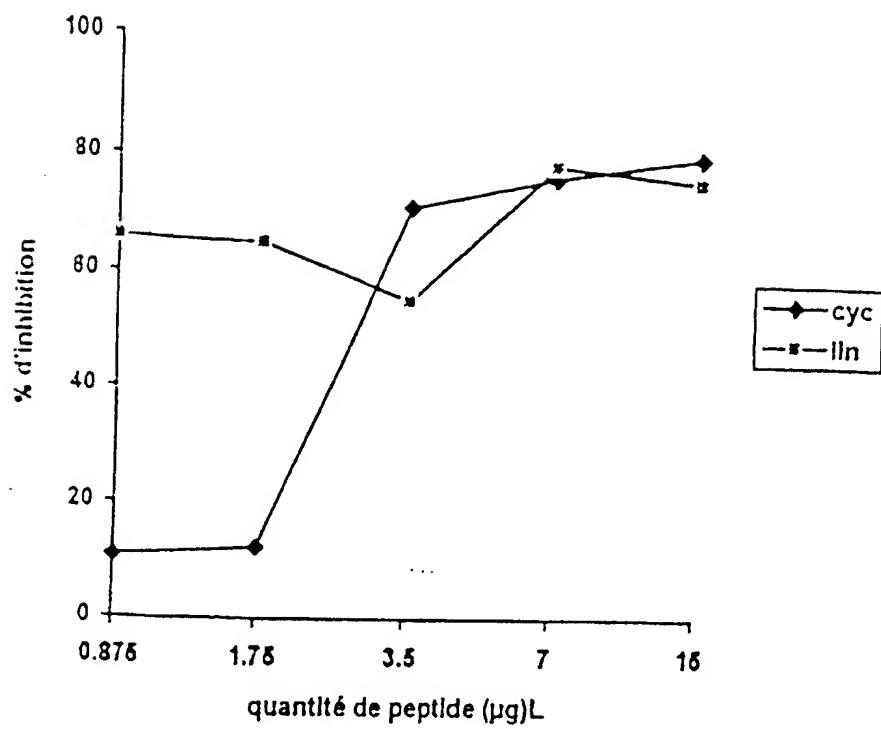
22. Compositions selon la revendication 21, caractérisées en ce qu'elles possèdent des propriétés anti-VRS et renferment au moins un peptide répondant à l'une des séquences SEQ ID N°7 à SEQ ID N°12 et tout particulièrement à la séquence SEQ ID N°9.

23. Compositions vaccinales caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'anticorps selon la revendication 14, dirigés contre les peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, ou de ligands équivalents en association avec un véhicule approprié.

2758331

1/5

FIGURE 1



2758331

VRS			
V_{H1}			
NH_2			
...	0	20	30
RS34B <u>QVKI.QESGFGLVAPSQTIS.LTCPI.SGFSL.I.TCPI.SGFSL.I.NYAVINWVRQ.PPGKGLI.WIAGGGTLYKSALMPRI.SITKDNISKSQVFLIMTSI.QTDATAMYCARIDPDYDIIYFYAHLVAGG</u>	CDR1..	CDR2..	CDR3..
RS18B2 <u>QVKI.QESGFGLVAPSQTIS.LTCPI.SGFSL.I.NYAVINWVRQ.PPRKGLEW.I.WIAGGGTLYKSALMPRI.SITKDNISKSQVFLIMTSI.QTDATAMYCARIDPDYDIIYFYAHLVAGG</u>	40	50	60
RS2B6 <u>QVKI.QESGFGLVAPSQTIS.ITCTVSGFSL.I.TCPI.SGFSL.I.TSYDISWVRQ.PPGKGLI.WIAGVWTGGGYYNSAFMSRI.SITNNNSKSOVFL.KMNSL.QTDATIYCVSRITGSPFATVHGG</u>	70	80	90
RS255 <u>QVKI.QQSSGGGLVQPGGERFKLSCAASGTFSSFGHIVWVRQAPEEGI.EPVAYISSSSSTIYYADIVVKGRSPSKKDNPKNPFLTQMTSIRSEDTAMYCARSKLKVVMIVWVHGG</u>	100	110	120
V_{L1}			
NH_2			
...	20	30	40
RS34B <u>GIVVAIEKVNICKSSSIENTRTRKNIILAWQQKPQSPKLIIWASTRDSGVNDRFTGSGCDDFTLSSVQAEDLAVVYCKQSUYIETFGSGTKLEIK</u>	CDR1..	CDR2..	CDR3..
RS18B2 <u>RSASP3DKVUMYCSARSSV</u>	50	60	70
RS2B6 <u>SLAVSLIQRATISYRASKSVSTSGYS</u>	80	90	100
RS255 <u>GERVSI.TCRASQPDIGSSLN</u>	110	120	130
$W1QEQPDGTYKLI.YATSSLQCPKRESGSISGSYSITISSLESDEVPPYCYQASSPFTEGSGCMLV$	140	150	160

2758331

VRS	CDR1	CDR2	CDR3
V _H			C _{COOH}
NH2	β^0	β^0	β^0
RS348	β^0	β^0	β^0
RS18B2	<u>NYAVI</u>	<u>VIWAGGGTLYKSALMP</u>	<u>DPDYYDIIYFYAYMIVY</u>
RS2B8	<u>NYAVH</u>	<u>VIWAGGGTLYKSALMP</u>	<u>DPDYYDIIYFYAYMIVY</u>
RS255	<u>SYDIS</u>	<u>VIWTGGGTYYNSAFMS</u>	<u>RIGTGPPFY</u>
	<u>SFGMH</u>	<u>YTSSGSSTIYYADTVKG</u>	<u>SRLRTVIVIY</u>
V _L			
NH2	β^0	β^0	β^0
RS348	β^0	β^0	β^0
RS18B2	<u>KSSQSLLENTRTRKNYLA</u>	<u>WASTRDS</u>	<u>KQS_{SYN}ET</u>
RS2B8	<u>SARSSV</u>	<u>PYMH</u>	<u>DTEKLAS</u>
RS255	<u>RASKSVSTSGYS</u>	<u>YMH</u>	<u>IVCDLES</u>
	<u>RASQPDIGSSLN</u>		<u>ATSSLDS</u>
			<u>LOVASSPFT</u>

2758331

4/5

FIGURE 4

VH 138

QVKLQESGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSHWIEWVKQRPGYGLEVIGEIFPG

RIITNYNEKFKGKATFTADTSNTAYMHFSSLTSEDSAVYYCAREGAGNHWGQ

VL138

VLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGATYLEEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPHRFSGSGSGTDFTLKISTVEAEDQGVYYCFQGSHVPRTFGGGTKLEIKR

VH133

VQLQESGSELVRPGGSVKLSCKASDYTLTSYWIHWVRQRPGPGLEWIGIIYPGSG
GTHYDEKFFTAKMTVDTSSTAYMQLSSLTSADSAVYYCICSYRNDDGYYAMDY
WGQ

VL 133

VLMTQTPLSLPVSLGDQASISCSSSQSLVHRDGNTYLHWYQQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGDYFCSQSTHVPLTFGTGTKLEIKR

5/5

FIGURE 5

RS-348	Péptides synthétiques
PEP1II	CGFSLTNYAVIIVWC
PEP2II	CVIWAGGGTLYKSALMPRC
PEP3II	CADDPDYDNFYAMDYWGPGTC
PEP4II	CKSSQSLENTRKNYLAC
PEP5II	CKLLIYWASTRDSGPDIFC
PEP6II	CYYKQSYNLFTFGSGTKC

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
nationalFA 538281
FR 9700300

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 94 06448 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE ET AL.) 31 mars 1994 * exemples * * revendications *	1-8, 13-23
X	--- WO 93 20210 A (SCOTGEN LTD.) 14 octobre 1993 * page 11, ligne 11 - ligne 34 * * exemples * * revendications *	1-8, 13, 15-23
A	E. KOHLI ET AL.: "Epitope mapping of the major inner capsid protein of group A rotavirus using peptide synthesis." VIROLOGY, vol. 194, no. 1, mai 1993, SAN DIEGO, CA, ÉTATS-UNIS, pages 110-116, XP002042517 * abrégé *	9-12, 18-20
A	G. LOUNSBACH ET AL.: "Binding of neutralizing monoclonal antibodies to regions of the fusion protein of respiratory syncytial virus expressed in Escherichia coli." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 74, no. 12, décembre 1993, LONDON, GRANDE BRETAGNE, pages 2559-2565, XP002042518 * le document en entier *	1-23
A	--- WO 96 40252 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORP.) 19 décembre 1996 * revendications *	1-23
A	--- WO 95 04081 A (ORAVAX INC.) 9 février 1995 * revendications *	1-23
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CLS) C07K
1	Date d'achèvement de la recherche 3 octobre 1997	Examinateur Nooij, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intramœtre		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant